



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

### **Tratamento da Surdez Neurosensorial: Perspetivas Futuras**

André Filipe Veiga Mascarenhas

---

**Maio 2018**



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

### **Tratamento da Surdez Neurosensorial: Perspetivas Futuras**

André Filipe Veiga Mascarenhas

**Orientado por:**

Dr. Marco Simão

---

**Maio 2018**

## **Resumo**

A surdez tem uma elevada prevalência a nível mundial, sendo a neurosensorial a forma mais comum. A morte ou disfunção das células ciliadas da cóclea é responsável pela grande maioria dos casos de surdez neurosensorial. O estudo das vias de sinalização reguladoras da proliferação e função de vários tipos celulares cocleares tem permitido encontrar novos alvos para o tratamento da surdez.

O tratamento atual da surdez neurosensorial baseia-se em aparelhos auditivos e implantes cocleares, mas estas opções terapêuticas não são aplicáveis a todos os casos. Já estão a ser desenvolvidas novas abordagens terapêuticas baseadas em tecnologias modernas como as células estaminais, manipulação genética e nanotecnologia aliadas com o conhecimento biomolecular crescente do ouvido interno humano.

Está a ser investigada a possibilidade de substituir as células cocleares mortas ou danificadas através do transplante de células estaminais para o ouvido interno ou do controlo da expressão genética dessas células. Têm sido discutidas várias possíveis áreas-alvo na cóclea para o tratamento farmacológico da surdez neurosensorial, embora ainda nenhum fármaco tenha sido aprovado pela FDA. Atualmente, a entrega dos possíveis agentes terapêuticos para a surdez neurosensorial numa área coclear específica representa um desafio significativo. Este obstáculo poderá ser ultrapassado com recurso à nanotecnologia dado que esta oferece uma possível entrega direcionada, não invasiva e eficiente de fármacos e biomateriais no ouvido interno.

Uma combinação de várias abordagens terapêuticas poderá permitir a regeneração bem-sucedida duma cóclea danificada. As novas estratégias terapêuticas têm o potencial de restaurar ou manter a função auditiva de forma mais eficaz e abrangente, representando assim o futuro tratamento da surdez neurosensorial.

**Palavras-chave:** surdez neurosensorial, cóclea, célula ciliada, célula estaminal, nanotecnologia.

O trabalho final exprime a opinião do autor e não da FML.

## **Abstract**

Hearing loss has a high prevalence worldwide and sensorineural is the most common form. Death or dysfunction of the cochlear hair cells is responsible for most cases of sensorineural hearing loss. The study of the signaling pathways regulating the proliferation and function of various cochlear cell types has allowed the emergence of new targets for the treatment of hearing loss.

The current treatment of sensorineural hearing loss depends on the use of hearing aids and cochlear implants, but these therapeutic options are not applicable to all cases. New therapeutic approaches are already being developed using modern technologies such as stem cells, genetic manipulation and nanotechnology together with the growing biomolecular knowledge of the human inner ear.

The possibility of replacing dead or damaged cochlear cells by transplanting stem cells into the inner ear or controlling the gene expression of these cells is currently being studied. Several cochlear areas are being studied as possible targets for the pharmacological treatment of sensorineural hearing loss, although no drug has yet been approved by the FDA. Nowadays, the delivery of possible therapeutic agents for sensorineural hearing loss in a specific cochlear area is a significant challenge. This problem can be overcome with the use of nanotechnology, which possibly offers directed, non-invasive and efficient delivery of drugs and biomaterials to the inner ear.

A combination of several therapeutic approaches could allow a successful regeneration of a damaged cochlea. The new therapeutic strategies have the potential to restore or maintain auditory function more effectively and in a broadened way, thus representing the future treatment of sensorineural hearing loss.

**Key-words:** sensorineural hearing loss, cochlea, hair cell, stem cell, nanotechnology.

The final work expresses the opinion of the author and not FML's.

# Índice

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>Pág.6</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>Pág.7</b>
<b>Fisiologia da audição.....</b>	<b>Pág.8</b>
<b>Fisiopatologia e etiologia da surdez neurosensorial.....</b>	<b>Pág.9</b>
<b>Tratamento atual.....</b>	<b>Pág.11</b>
<b>Implantes auditivos de tronco cerebral.....</b>	<b>Pág.13</b>
<b>Terapia celular.....</b>	<b>Pág.14</b>
<b>Terapia genética.....</b>	<b>Pág.21</b>
<b>Fármacos.....</b>	<b>Pág.24</b>
<b>Nanotecnologia.....</b>	<b>Pág.27</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>Pág.30</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>Pág.32</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>Pág.33</b>

## Abreviaturas

OMS – Organização Mundial de Saúde

SNHL – surdez neurosensorial (sensorineural hearing loss)

CC – célula ciliada

IC – IC

OC - órgão de Corti

CCE – célula ciliada externa

CCI – célula ciliada interna

SGN – neurónio do gânglio espiral

NIHL - surdez induzida por ruído (noise-induced hearing loss)

TTS – mudança temporária de limiar auditivo (temporary threshold shift)

PTS – mudança permanente de limiar auditivo (pemanent threshold shift)

ARHL – presbiacusia (age-related hearing loss)

SSNHL - surdez neurosensorial súbita

dB – decibel

ABI – implante auditivo de tronco cerebral (auditory brainstem implant)

FDA – Food and Drug Administration

NF2 - neurofibromatose tipo 2

AMI – implante auditivo de mesencéfalo (auditory midbrain implant)

SC – célula estaminal

HSC - célula estaminal hematopoiética

ESC – célula estaminal embrionária

iPSC - célula estaminal pluripotente induzida

NSC – célula estaminal neural

hFASC – célula estaminal da cóclea fetal humana

NT - neurotrofina

AAV – vírus adeno-associados

siRNA – small interfering RNA

RWM – membrana da janela redonda (round window membrane)

ROS - espécies reativas de oxigénio

NP – nanopartícula

SPION - nanopartícula de óxido de ferro superparamagnética

## Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a surdez é a forma mais comum de déficit sensorial nos seres humanos, afetando 5% da população mundial [45]. O início da doença e a sua progressão são extremamente variáveis, tendo um impacto muito negativo na comunicação e qualidade de vida dos doentes [1,2,3].

A surdez neurosensorial (SNHL) é causada pela morte ou disfunção de tipos celulares particulares presentes na cóclea, principalmente das células ciliadas (CCs) [1,8,9]. As CCs são facilmente danificadas pelo envelhecimento, bem como em episódios de ototoxicidade e trauma acústico. Os danos nestas células geralmente ocorrem logo após a lesão e podem resultar em surdez permanente [9,10]. Pode ser causada por fatores ambientais, mas é cada vez mais claro que fatores genéticos também têm um papel central na etiologia da doença [1,6].

Atualmente, o tratamento da SNHL baseia-se principalmente em dispositivos médicos, como os aparelhos auditivos e os implantes cocleares (ICs), ineficazes em muitos dos casos [4,7,11]. A identificação dos defeitos genéticos que provocam surdez tem sido fundamental na descoberta das vias moleculares envolvidas na regulação da percepção auditiva, sendo um ponto de partida para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas [6,8,12]. Avanços significativos na medicina regenerativa e terapia genética oferecem alternativas para a restauração da surdez ou para o abrandamento da sua progressão. A regeneração das CCs tem sido o foco de investigação principal destas abordagens biológicas [5,6,12]. Ainda não existe terapêutica farmacológica de uso generalizado, mas esta também é uma opção muito promissora [6].

A elevada prevalência da surdez combinada com a falta de opções terapêuticas constitui um grande desafio na área da otologia e audiologia, sendo necessária a procura de soluções terapêuticas [3,5,7].

## Fisiologia da audição

A percepção do som é mediada por células mecanossensoriais localizadas no ouvido interno – as CCs [1,3,13]. Nos mamíferos, estas células perdem o seu potencial regenerativo após o desenvolvimento embrionário, logo a perda de CCs leva a surdez permanente [4,6,10].

O sistema auditivo humano é uma estrutura muito complexa com muitos tipos celulares. O órgão de Corti (OC), localizado na cóclea, é responsável pela deteção de som pois possui o epitélio sensorial auditivo. Este contém aproximadamente 16.000 CCs distribuídas em três filas de CCs externas (CCEs) e uma de CCs internas (CCIs), e as respetivas células de suporte [14]. Cada CC contém na sua superfície apical um feixe ciliar constituído por múltiplos estereocílios. A membrana tectorial é uma matriz extracelular que cobre a superfície apical do OC, estando anexada aos feixes ciliares das CCEs. Os corpos celulares das CCs formam contatos especializados com as células de suporte que, por sua vez, aderem à membrana basal [3,8,12].

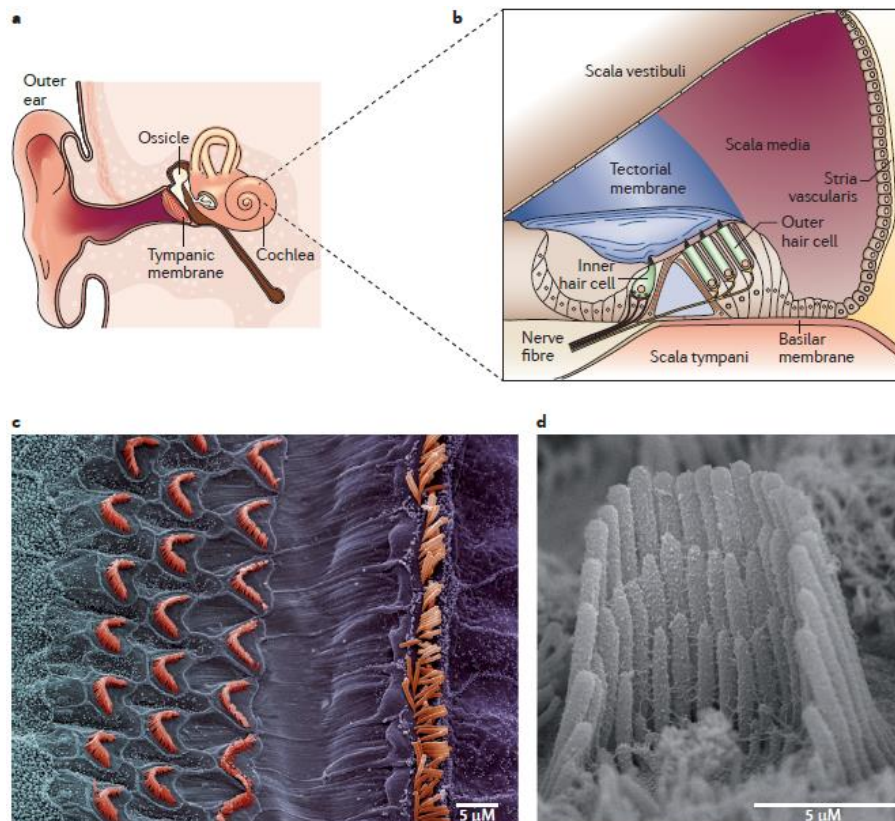
A cóclea divide-se em 3 ductos: coclear, timpânico e vestibular. Os ductos timpânico e vestibular estão preenchidos com perilinfa, que tem baixo teor de potássio e elevado teor de sódio. Já o ducto coclear é preenchido com endolinfa, que tem elevado teor de potássio e baixo teor de sódio. Esta diferença nas concentrações de iões é importante na manutenção do potencial endococlear e da homeostase coclear. A porção superior do ligamento espiral forma a parede lateral do ducto coclear e é constituída por inúmeros vasos sanguíneos – stria vascularis, sendo esta a responsável pela produção de endolinfa [1,10,15].

A audição inicia-se quando as ondas sonoras que atingem o ouvido externo viajam através do canal auditivo até à membrana do tímpano, onde a energia sonora é transferida pelos ossículos do ouvido médio até à janela oval. Os movimentos da mesma provocam ondas de pressão no fluido presente no interior da cóclea, que atravessam o ducto coclear e induzem vibrações na membrana basal e, seguidamente, nas CCs, levando à deflexão dos seus feixes ciliares. Quando estes se movem sincronicamente provocam a abertura de canais iónicos mecanossensoriais, levando à despolarização das CCs e à libertação de neurotransmissores nos neurónios aferentes, que sinapsam com as CCIs e conduzem os sinais elétricos até ao gânglio espiral, que por sua vez se continua



pelo nervo coclear e depois pelo sistema nervoso central, sendo a informação processada no tronco cerebral, córtex auditivo e áreas superiores do cérebro [11,12,16].

As CCs não são homogêneas ao longo da cóclea, existindo uma organização tonotópica no OC devido à mudança gradual de algumas características, tais como a largura e espessura da membrana basal e a altura dos estereocílios. Assim, as CCs estão sintonizadas para frequências específicas ao longo do ducto coclear [3,6].

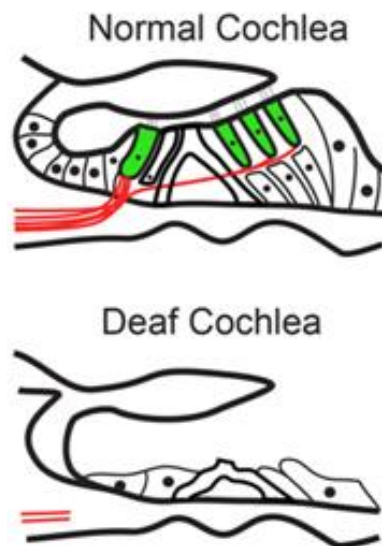


**Figura 1.** a) diagrama do órgão auditivo humano; b) secção transversal da cóclea; aos ductos vestibular, coclear e timpânico correspondem as scalas vestibuli, media e tympani, respetivamente; c) imagem à microscopia eletrónica de varredura dos feixes ciliares das CCs; d) ampliação de uma CCE para revelar a estrutura do feixe ciliar [6].

## Fisiopatologia e etiologia da surdez neurosensorial

A SNHL é a forma mais comum de deficiência auditiva, sendo causada por qualquer problema que impeça a conversão dos sinais sonoros em sinais elétricos ou a transmissão desses sinais ao cérebro [7,11,20]. Independentemente da etiologia, a morte ou disfunção das CCs é o passo inicial da maioria dos casos de SNHL, causando a degeneração dos neurónios do gânglio espiral (SGNs) e do OC [17,18]. Geralmente é

irreversível e progressiva dado que a cóclea madura de mamíferos não apresenta capacidade inerente para se regenerar após lesão [3,19,21]. Pode ser congénita ou adquirida, podendo manifestar-se em qualquer idade. Já foram identificadas inúmeras causas, incluindo genética, ruído, doenças autoimunes, fármacos, envelhecimento, trauma, infeções, sendo nalguns casos desconhecida [11,12,22].



**Figura 2.** Numa cóclea normal o OC contém CCs (a verde) e células de suporte. As fibras periféricas dos SGNs (a vermelho) formam conexões sinápticas com as CCs. Numa cóclea surda, as CCs são danificadas e o OC perde a integridade estrutural fornecida pelas células de suporte. As fibras periféricas dos SGNs retraem-se e degeneram [5].

Quanto à SNHL genética, esta pode ser não síndrómica, isto é, só a função auditiva está alterada, ou síndrómica, quando a surdez é acompanhada por outra disfunção. Estas duas formas são altamente heterogêneas geneticamente e podem ser causadas por mutações em até 500 genes. Os genes que estão ligados à surdez codificam proteínas com uma ampla gama de funções, o que faz com que muitas vias moleculares sejam potenciais alvos terapêuticos. A maioria dos genes ligados às formas genéticas de surdez são expressos nas CCs, mas existem mutações identificadas em muitos outros elementos cocleares [1,6,23].

Outra causa de SNHL é o ruído – surdez induzida pelo ruído (NIHL). A exposição ocupacional ao ruído é responsável por aproximadamente 10% dos casos de surdez em adultos. Impulsos curtos de ruído de alta intensidade podem causar surdez, que geralmente é irreversível e associada a danos generalizados no sistema auditivo, sendo por isso muito difícil de tratar. Uma população-alvo mais promissora para

intervenção terapêutica são os indivíduos expostos a ruído moderado a intenso que não causa dano estrutural severo de imediato, mas induz uma mudança temporária ou permanente de limiar auditivo (TTS ou PTS, respetivamente). Mesmo que a mudança de limiar em resposta ao ruído seja completamente recuperada, a TTS está na mesma associada a dano permanente às sinapses auditivas. A suscetibilidade a danos causados pelo ruído difere significativamente entre indivíduos, o que indica que fatores genéticos podem ser importantes na etiologia da doença [6,11].

A SNHL também pode ser causada quimicamente por agentes ototóxicos. Vários fármacos são ototóxicos, tais como os aminoglicosídeos, quimioterápicos contendo platina, diuréticos de ansa, anti-inflamatórios não esteroides, quinina e metais pesados [11,24].

Outra forma de SNHL é a presbiacusia (ARHL), a surdez associada ao envelhecimento. É simétrica e começa com a perda das frequências altas. A idade de início, progressão e gravidade são muito variáveis, sendo a fonte desta variabilidade tanto genética quanto ambiental. Afeta 35% dos indivíduos com mais de 65 anos e 47% dos indivíduos com mais de 75 anos, sendo o défice sensorial mais comum nos idosos. Os três tipos principais de ARHL são: sensorial, na qual ocorre perda de CCs e consequente degeneração neuronal; neural, em que ocorre degeneração neuronal primária; e metabólica, associada a atrofia da stria vascularis [6,8].

A SNHL súbita (SSNHL) é a perda auditiva de 30 dB ou mais em pelo menos três frequências audiométricas contíguas num período de 72 horas [25,28].

## **Tratamento atual**

O tratamento atual da SNHL baseia-se na amplificação da fala com aparelhos auditivos e na estimulação elétrica dos SGNs sobreviventes com ICs. No entanto, estas opções terapêuticas não são aplicáveis a todos os doentes [3,4,8].

Os aparelhos auditivos convencionais ampliam o som e podem ser utilizados de forma eficaz apenas na SNHL ligeira a grave porque dependem das CCs e neurónios sobreviventes. Apesar dos aparelhos auditivos não restaurarem totalmente a audição normal, melhoram significativamente a comunicação nos casos de surdez leve a moderada [1,8,29].

Atualmente, a implantação coclear é a única opção terapêutica na SNHL grave a profunda. Estes dispositivos contornam as CCs danificadas, estimulando diretamente as fibras do nervo auditivo sobreviventes [17,22,24]. Possui três componentes externos (microfone, processador e transmissor, responsáveis pela recepção, codificação e transmissão do som, respetivamente) e uma componente implantada, responsável por converter o código recebido em sinais elétricos que estimulam o gânglio espiral [24,29].

Os candidatos à implantação coclear dividem-se em dois grupos principais: crianças com surdez congénita ou pré-lingual ou adultos com surdez pós-lingual. Antes de considerar a implantação coclear, um indivíduo não deve demonstrar qualquer benefício com aparelhos auditivos [24]. Na ausência de outras doenças e/ou incapacidades, as crianças que colocam ICs adquirem a fala e as capacidades comunicativas a um ritmo semelhante ao das crianças sem problemas auditivos. Além disso, a melhoria das capacidades comunicativas após a implantação coclear mantém-se a longo prazo [1,8].

Embora os ICs tenham ótimos resultados nalguns casos, há uma grande variabilidade no seu desempenho e eficácia. Os seus utilizadores geralmente têm dificuldades em ambientes com ruído de fundo e na localização dos sons. Embora a implantação bilateral ou a estimulação bimodal (uso de aparelho auditivo contralateral ao IC) permitam contornar estas dificuldades, a variabilidade no desempenho dos dispositivos mantém-se. Os utilizadores de ICs também apresentam uma fraca perceção do tom, o que interfere com a perceção da música e com a representação de algumas línguas [8]. Além disso, a implantação deste dispositivo implica uma cocleostomia, processo cirúrgico que pode causar danos permanentes no ouvido interno [12]. Embora o desenvolvimento do IC tenha sido notável, o prognóstico para os indivíduos que o recebem é muito variável e, mesmo com os melhores resultados, a audição normal não é restaurada [3].

Apesar da tecnologia dos ICs ter evoluído significativamente desde o desenvolvimento dos primeiros dispositivos, os benefícios do uso dos mesmos estagnaram. Tem-se tentado melhorar o seu desempenho através da integração com abordagens biológicas que visam a preservação dos neurónios auditivos endógenos [4,8].

A SSNHL idiopática resolve-se espontaneamente em 45 a 65% dos casos, existindo alguma controvérsia relativamente ao tratamento desta forma de surdez. Já foram investigados numerosos agentes para o tratamento da mesma, incluindo anti-

inflamatórios, antibióticos, entre outros. A enorme diversidade de opções terapêuticas em estudo resulta do debate relativamente à etiologia da SSNHL idiopática, da relativa raridade da doença e da falta de uma opção terapêutica claramente superior [25,26,27].

Assim, os doentes com SNHL anseiam por estratégias alternativas que permitam a reabilitação auditiva em todos os casos e com maior eficácia [3,5,24].

## **Implantes auditivos de tronco cerebral**

O implante auditivo de tronco cerebral (ABI) é um dispositivo tecnologicamente semelhante a um IC, com a diferença de que o eléctrodo é colocado na superfície do núcleo coclear do tronco cerebral. Apesar do IC ser uma opção viável na maioria dos casos de surdez induzida por agentes ototóxicos, casos graves que envolvem danos do nervo auditivo representam uma contra-indicação absoluta. Assim, os candidatos ao ABI têm surdez causada por nervos auditivos não funcionais ou inexistentes [17,24,30].

A FDA (Food and Drug Administration) apenas aprovou os ABIs em doentes com 12 anos ou mais com neurofibromatose tipo 2 (NF2) que perderam a audição devido à ressecção de neuromas acústicos. As indicações para os ABIs na Europa Ocidental incluem fraturas ósseas temporais, aplasia do nervo auditivo e ossificação severa da cóclea. Os distúrbios adquiridos que comprometem o nervo auditivo e o tratamento de resgate em doentes que obtiveram maus resultados com o IC também são casos potencialmente adequados para o uso de ABIs.

Após a implantação do eléctrodo no núcleo coclear, aplica-se um estímulo eléctrico de forma a provocar um potencial evocado do tronco cerebral para verificar a posição do ABI e diminuir o risco de estimulação dos nervos cranianos adjacentes. Seis a oito semanas após a implantação, o ABI é estimulado pela primeira vez. O processo de programação é muito complexo, sendo realizado um acompanhamento trimestral durante o primeiro ano de forma a se otimizar o desempenho do dispositivo. Na maioria dos casos, os ABI não funcionam tão bem como os ICs e muitas vezes requerem a leitura labial de forma a facilitar a comunicação.

A tecnologia mais recente em próteses auditivas começou a atingir níveis superiores da via auditiva através da implantação do eléctrodo a nível do mesencéfalo. Os implantes auditivos de mesencéfalo (AMI) ultrapassam o núcleo coclear e o

implante é feito no colículo inferior. Embora a intervenção cirúrgica seja segura, a colocação precisa do implante é difícil, levando a resultados muito diferentes entre doentes. Mesmo a colocação mais precisa ainda só permitiu a percepção da fala com pistas visuais. Os doentes com NF2 com sucesso limitado após colocação do ABI parecem ser o grupo que mais beneficia da colocação do AMI [24,30].

## Terapia celular

Todos os vertebrados que não os mamíferos aparentemente regeneram as CCs ao longo da sua vida graças a uma população de SCs existente no epitélio sensorial auditivo [1,4]. Este fenómeno já foi bem estudado no epitélio auditivo das aves e nos neuromastos da linha lateral dos peixes-zebra. Nestes animais, a transdiferenciação direta ou a divisão celular das células de suporte permitem a regeneração das CCs [3,8]. Um baixo nível de regeneração espontânea das CCs é possível no OC embrionário de ratinhos quando cultivado *in vitro* e algumas moléculas expressas durante o desenvolvimento embrionário são capazes de induzir a produção de CCs supranumerárias [6]. A comparação das vias de sinalização celular que são ativadas durante o desenvolvimento embrionário das CCs em mamíferos e na regeneração de CCs nas aves sugere uma grande conservação dos mecanismos moleculares. No entanto, os mamíferos perderam a capacidade de reiniciar estes programas. Tem havido um progresso significativo na identificação das vias endógenas de sinalização envolvidas na proliferação e regeneração das CCs [3,4,20].

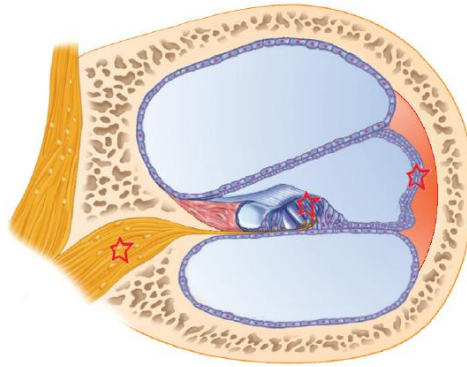
Uma possível atuação nos mecanismos reguladores supressivos poderia superar o bloqueio da regeneração das CCs nos mamíferos. A identificação de genes pró-CCs e a regulação da sua expressão é uma área de investigação crescente. O gene ATOH1 é essencial e suficiente para a génese das CCs [8,12,31]. A expressão deste gene leva à ativação da via de sinalização Notch que, por sua vez, suprime o programa de diferenciação em CCs nas células de suporte. Em ratinhos recém-nascidos, a inibição Notch permitiu a regeneração das CCs após dano ototóxico. ATOH1 deve ser ativada pela via de sinalização canónica Wnt no momento apropriado para a diferenciação de CCs continuar. Pensa-se que os ligandos desta via molecular sejam segregados por células que estão fora do epitélio sensorial e que a sua produção possa cessar no ouvido adulto. O *knockout* dos genes que produzem os inibidores do ciclo celular expressos

quando as células progenitoras se diferenciam em CCs aumenta a proliferação das CCs. Assim, estratégias que permitam superar os bloqueios à divisão celular podem melhorar a reprogramação dependente de ATOH1. Estes mecanismos bloqueadores da regeneração podem não ser moleculares, já tendo sido sugeridas outras hipóteses: uma barreira à difusão causada pelas membranas basal e tectorial ou um bloqueio mecânico mediado por uma rede apical de actina expandida a partir das células de suporte [6,12].

No entanto, a regulação de muitas características importantes da formação e função destas células permanece desconhecida. Enquanto o gene ATOH1 parece ser suficiente para a formação das CCs, as vias a jusante que especificam o tipo de CC e os mecanismos que determinam as alterações morfológicas das CCs ao longo da cóclea ainda não foram determinados. Os fatores específicos que iniciam a expressão de ATOH1 estão a começar a ser identificados e ainda não é claro quais as células no ouvido interno embrionário que têm a capacidade de se desenvolver como CCs [3,8].

A terapia celular consiste no transplante de células para o ouvido interno com o objetivo de substituir as células cocleares mortas ou danificadas e, desta forma, reverter a surdez. Estas células podem ser recuperadas através da indução do ciclo celular de células progenitoras presentes no ouvido interno ou através do transplante de SCs exógenas induzidas a se diferenciarem em CCs [5,21,22].

Diferentes áreas cocleares podem ser alvo da terapia celular. Quase todas as perdas auditivas estão associadas às CCs, sendo estas o principal alvo [5,10]. No entanto, quase todas as perdas auditivas evoluem com a perda de células de suporte, seguida da degeneração do nervo coclear. Embora o SGN possa ser alvo da terapia celular, a audição não pode ser restaurada somente com um SGN intacto. Além disso, nos casos de surdez em que a perda de SGNs e fibras nervosas já foi detetada, um problema de CCs subjacente ainda deve ser considerado. A parede lateral da cóclea também pode ser alvo da terapia celular. O problema da escolha da área-alvo é que os testes audiológicos não refletem as verdadeiras alterações histopatológicas presentes no ouvido interno destes doentes [1,10].



**Figura 3.** Áreas cocleares potencialmente alvo da terapia celular: epitélio auditivo sensorial, SGN e stria vascularis [10].

O número de SCs endógenas possivelmente presentes numa cóclea madura é muito baixo ou mesmo nulo. Existem SCs no epitélio jovem, mas o seu número diminui significativamente ao longo do tempo [3]. Ainda não é certo que a cóclea adulta possua uma população de SCs e ainda nada demonstrou a existência de substituição celular na cóclea de mamíferos adultos [4,8]. A identificação de marcadores de superfície celular específicos das SCs do ouvido interno teria implicações significativas para a diferenciação das eventuais SCs endógenas do ouvido interno ou SCs exógenas, possibilitando a reparação do epitélio sensorial auditivo [3,6,24].

Quando isoladas e cultivadas *in vitro*, as células de suporte cocleares são capazes de expressar marcadores das CCs, o que sugere que estas se diferenciam nesse tipo celular. No entanto, ao contrário das SCs, estas não se auto-renovam. Será importante perceber se as células de suporte cocleares são um alvo viável para a conversão em CCs ou se existem outras células na cóclea relativamente desdiferenciadas que possam ser diretamente direcionadas [4,8].

Outra possível fonte de SCs dentro da cóclea são as células mesenquimais, que derivam continuamente de SCs hematopoiéticas (HSCs) e são substituídas lentamente ao longo do tempo. Embora a maioria das células mesenquimais do ouvido interno se diferenciem em fibrócitos ou macrófagos, a possibilidade de que algumas possam substituir as CCs parece uma hipótese intrigante [3].

O transplante de SCs exógenas para o ouvido interno apresenta um potencial muito limitado de diferenciação generalizada nos vários tipos celulares presentes no OC e a expressão de alguns marcadores cocleares não significa necessariamente que essas células se desenvolvam completamente em tecido sensorial ou nervoso maduro. Em vez



de se injetarem SCs *naive* na cóclea adulta, é mais benéfico direcioná-las no sentido de CCs, expondo-as sequencialmente aos sinais presentes no seu desenvolvimento [3,8].

Já foram produzidas células que possuem muitas características das CCs a partir de SCs embrionárias (ESCs) e SCs pluripotentes induzidas (iPSCs) [10,13,19]. As CCs derivadas de iPSCs parecem indistinguíveis das derivadas de ESCs, mas a eficiência da indução foi menor. As técnicas de diferenciação de SCs em CCs *in vitro* devem ser desenvolvidas de forma a melhorar a eficiência desta indução. O sucesso do direcionamento da diferenciação é a entrega dos sinais presentes na gênese normal das CCs [6,13,21].

As SCs neurais (NSCs) expressam marcadores cocleares mais facilmente do que as ESCs e as HSCs. Durante o desenvolvimento embrionário, a cóclea e o cérebro partilham vias de sinalização semelhantes e o desenvolvimento coclear é dependente de vários sinais enviados pelo sistema nervoso central, sendo necessária uma menor reprogramação para que uma NSC expresse marcadores cocleares [8,19,20]. NSCs derivadas do cerebelo fetal de ratinhos (cNSCs) injetadas no ducto timpânico de ratinhos e porquinhos-da-Índia foram capazes de substituir os tipos de células cocleares perdidos após trauma acústico, tendo migrado para o gânglio espiral e para o OC. Estas células substituíram o tecido nervoso danificado, promoveram a recuperação funcional e expressaram vários marcadores cocleares. As cócleas que foram transplantadas com cNSCs exibiram um número significativamente maior de células satélites e SGNs. No entanto, não se sabe se estas células foram geradas de novo ou resultaram da preservação de células já existentes [8,20].

À medida que as células migram dentro da cóclea, recebem sinais do microambiente e aumentam a expressão genética de programas de destino celular expressos pelas células endógenas locais [20]. Assim, o transplante de células indiferenciadas ou parcialmente diferenciadas de forma a que se diferenciem em células semelhantes às CCs na área alvo, rodeadas por células de suporte, parece ser a opção mais viável [10,19,21]. As cNSCs transplantadas exibiram os padrões de expressão esperados pelas células endógenas do ambiente local. A expressão atípica de miosina 7A em células derivadas das cNSCs demonstra que a capacidade destas células se diferenciarem completamente num tipo de célula coclear pode ser limitada dado que as CCs são normalmente o único tipo de células cocleares que expressa este marcador. As NSCs podem ser uma ferramenta terapêutica útil para reparar cócleas danificadas pois

podem integrar-se no tecido coclear e diferenciar-se numa variedade de tipos de células cocleares [8,20].

Mais recentemente, foi gerado epitélio sensorial do ouvido interno funcionando a partir de SCs pluripotentes [10].

Já foi isolada uma população de SCs da cóclea fetal humana (hFASCs) capaz de produzir CCs e neurónios. No entanto, as hFASCs entram em senescência replicativa rapidamente, existindo a necessidade de uma fonte confiável e renovável de células progenitoras humanas com capacidade de produzir ambos os tipos celulares para a substituição sensorial. Além disso, isolar SCs do ouvido interno humano levanta questões éticas, sendo esta uma abordagem pouco útil clinicamente [2,6,19].

Atualmente, não existe nenhum tratamento rotineiro para a perda de SGNs dado que a falta de inervação limita a eficácia de um IC. A utilização de NSCs para recuperar os circuitos sensoriais danificados é uma estratégia terapêutica potencial. A integração das células transplantadas parece mais viável no gânglio espiral do que no epitélio auditivo [8,10,21].

Células progenitoras neurais derivadas de ESCs humanas transplantadas para a cóclea de mamíferos com danos nos SGNs incorporaram o gânglio espiral e permitiram uma recuperação funcional substancial. Houve uma correlação significativa entre o aumento da densidade neural e a redução do limiar auditivo [8,10,17]. Além disso, já se demonstrou que neurónios derivados de SCs estendem dendrites em direção ao OC e inervam as CCs, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estes resultados e o acesso cirúrgico relativamente fácil ao canal de Rosenthal sugerem que neurónios derivados de SCs podem ser utilizados para reinervar as CCs em doentes com neuropatia auditiva e degeneração do gânglio espiral secundária a SNHL de longo prazo [2,3,24].

A função e eficácia de um IC dependem da presença de SGNs residuais, embora ainda não tenha sido estabelecida uma correlação rigorosa entre o número de gânglios e o desempenho do IC. Assim, a combinação da terapia celular com um IC pode oferecer uma solução terapêutica a doentes que atualmente permanecem sem tratamento viável e também permitir uma maior restauração da acuidade auditiva aos doentes que utilizam ICs [1,22].

A stria vascularis e o ligamento espiral poderiam ser alvos adicionais para a terapia celular. Mutações em genes que codificam diferentes junções celulares existentes nestas estruturas causam surdez. Além disso, já foi descrita a perda de fibrócitos no ligamento espiral de ratinhos com o envelhecimento e trauma acústico. A

transplantação de SCs poderia levar à reorganização dos componentes celulares da stria vascularis ou do ligamento espiral, mas ainda é desconhecido o mecanismo subjacente à diferenciação celular destas estruturas [3,10].

Outra possível aplicação da terapia celular no tratamento da surdez é criar SCs geneticamente modificadas produtoras de fatores que promovam a regeneração de estruturas específicas dentro do ouvido interno. Este conceito seria especialmente adequado na promoção da regeneração ou reparação endógena através da secreção de um fator parácrino ou endócrino. Os SGNs demonstraram crescer em direção a neurotrofinas (NTs), sugerindo que uma fonte destes fatores poderia promover a regeneração e melhorar o desempenho dos ICs. A hipótese de que as SCs possam ser direcionadas ou atraídas para locais de lesão através da possível libertação de fatores tróficos ainda não foi demonstrada. Outra hipótese seria a combinação de SCs geneticamente modificadas secretoras de sinais metabólicos e/ou humorais específicos com um transplante de SCs endógenas para aumentar a regeneração no ouvido interno [3].

Ainda existem muitos obstáculos que impedem a aplicação da terapia celular à SNHL, além dos problemas básicos associados às SCs, como a formação de tumores e a rejeição imune [8,10]. O principal obstáculo é a dificuldade em colocar as células transplantadas na área coclear correta. Algumas das SCs transplantadas para o ouvido interno diferenciam-se em tipos celulares potencialmente relevantes, mas a grande maioria perde-se várias semanas após o transplante [3,6]. Também permanece a dúvida se estas células são funcionais. Além disso, não é expectável que células transplantadas ou que migrem para o ducto coclear sobrevivam facilmente, dado o elevado teor de potássio da endolinfa [1,3,21].

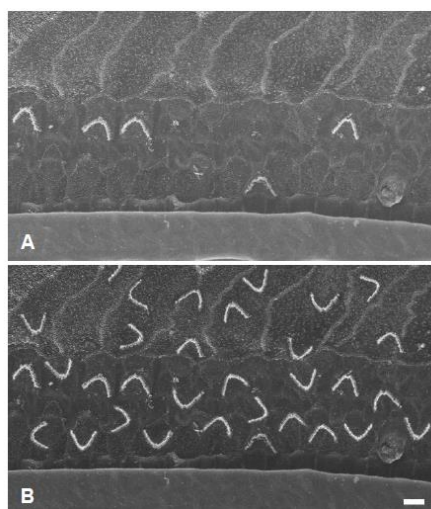
As superfícies luminais das CCs e das células de suporte estão unidas por inúmeras tight junctions, formando a lâmina reticular. Quando uma CC se perde, as células de suporte circundantes expandem os seus processos luminais de forma a selarem a abertura desta lâmina, formando-se uma cicatriz que pode limitar a chegada das SCs transplantadas ao OC a partir do ducto coclear. A membrana basal também parece representar um obstáculo significativo para o acesso das SCs a partir do ducto timpânico [3,21].

O transplante de células para a cóclea é um desafio também pelo facto desta se localizar no centro do crânio, cercada por estruturas ósseas. As técnicas cirúrgicas convencionais podem perturbar a homeostase coclear e limitam o acesso apenas ao

ducto timpânico, sendo duvidoso que CCs transplantadas neste ducto migrem para o ducto coclear e outras áreas-alvo. Além disso, ainda não se conhece o padrão detalhado do fluxo linfático na cóclea [11,32].

A audição não pode ser obtida apenas com a transdução mecanoelétrica permitida pelas CCs. A transferência do sinal elétrico gerado para o sistema nervoso central é obrigatória, devendo as novas CCs formar sinapses funcionais com os SGNs adequados [3,8,22].

Ainda não se sabe se as CCs transplantadas se orientariam na posição normal. Caso não o fizessem, todo o sistema não funcionaria adequadamente pois os estereocílios mover-se-iam de forma assíncrona [1,10].



**Figura 4.** Direções das CCs no epitélio auditivo: A) epitélio auditivo danificado; B) epitélio auditivo com SCs transplantadas [10].

Diferentes tipos de SCs já foram direcionadas com sucesso para o destino de CCs. No entanto, a ineficiência relativa da indução das CCs juntamente com a exigência de fatores desconhecidos indicam que ainda há muito para ser descoberto [6,21].

O transplante de células para o ouvido interno parece ser relativamente seguro, mas até à data não demonstrou ter um grande impacto na reorganização do epitélio sensorial. Será importante definir as SCs e as células progenitoras do ouvido interno com base em marcadores imunocitológicos, localização, atividade clonal e potência [3]. A cóclea madura retém os sinais necessários para influenciar a diferenciação de SCs num fenótipo coclear, embora não possa regenerar essas células a partir da sua própria população endógena [3,20]. É necessária mais investigação para esta tecnologia ser clinicamente viável [8]. A formação bem-sucedida de células semelhantes a CCs a partir de SCs é um desenvolvimento promissor para o teste de novos agentes farmacológicos e

pode contribuir para a identificação de fatores genéticos, farmacológicos e ambientais causadores de danos ou disfunção nas CCs [1,6].

## Terapia genética

A terapia genética envolve a *upregulation* ou *downregulation* de genes específicos com o objetivo de tratar uma doença e a sua investigação é especialmente importante nos casos em que os tratamentos convencionais não são eficazes [18,32]. A investigação da terapia genética no tratamento da SNHL teve como primeiro alvo o gene ATOH1 [8,24].

Um vírus adeno-associado (AAV) forçou a expressão de ATOH1 nas células de suporte cocleares de porquinhos-da-Índia surdos e, 2 meses depois, estes possuíam mais CCs funcionais e uma audição significativamente melhor. Estes resultados sugerem que ATOH1 pode permitir que as células de suporte se transdiferenciem diretamente em CCs, sugerindo a presença de células progenitoras e/ou SCs que mantêm algum potencial para se desenvolverem em CCs na cóclea adulta [1,6,8,24]. A entrega de ATOH1 também demonstrou ser benéfica nas CCs sobreviventes, ao permitir a regeneração dos feixes ciliares perdidos. No entanto, a janela terapêutica parece ser curta pois a terapia deve ser realizada logo após a lesão [34,35,36].

O gene GJB2 codifica a conexina 26 e é expresso nas células de suporte da cóclea. Esta proteína faz parte de junções comunicantes envolvidas na reciclagem dos iões potássio, contribuindo para a manutenção do potencial eletroquímico da endolinfa. Já foi demonstrada a eficácia da entrega de GJB2 com AAVs em ratinhos *knockout* para este gene na restauração das junções comunicantes das células de suporte. Embora não tenha havido uma melhoria significativa da audição, estratégias eficazes que permitam restaurar a função das junções comunicantes na rede de células de suporte cocleares humanas poderiam beneficiar uma percentagem substancial de doentes com surdez genética pois mutações no gene GJB2 são responsáveis por cerca de 50% dos casos [1,6,8].

Na maioria dos casos de surdez hereditária recessiva, a restauração da audição exigirá a entrega do gene em falta ou do respetivo produto. Já se demonstrou a restauração da audição em ratinhos *knockout* VGLUT3 (um transportador de solutos) reintroduzindo o DNA complementar VGLUT3 nas CCIs [1,6,37]. Como muitas formas

de surdez são herdadas de forma dominante, uma potencial estratégia terapêutica é a inibição seletiva do produto genético dominante de forma que a cópia *wild type* restaure a função. A forma mutante dominante do gene GJB2 foi expressa na cóclea de um ratinho, provocando a elevação dos limiares auditivos. A co-transfecção de um siRNA (small interfering RNA) visando especificamente a estrutura dominante permitiu a restauração dos limiares auditivos [1,6,12]. A transfecção de siRNAs em várias células-alvo na cóclea em diferentes momentos tem sido investigada dado que estes agentes permitem silenciar genes específicos [12,38].

Já foram desenvolvidos modelos animais para o estudo da terapia genética *in utero*. Experiências iniciais demonstraram que a entrega de plasmídeos ao ouvido interno dum ratinho embrião direcionou a expressão proteica numa fração substancial das CCs. A correção de defeitos genéticos em embriões humanos usando técnicas *in utero* pode provar-se viável no futuro, embora os aspetos técnicos e éticos possam impedir a prática desta estratégia [6,39].

À medida que a gravidade da surdez aumenta, a necessidade de manter ou regenerar os nervos auditivos é de importância cada vez maior, particularmente para os utilizadores de ICs [1,18,24]. As NTs são uma família de moléculas cruciais para a manutenção e desenvolvimento do sistema nervoso e são utilizadas em terapia genética dirigida à preservação dos SGNs. Assim, as NTs têm o potencial de prolongar a duração e o benefício dos ICs [6,11,32].

A terapia genética com NT direcionada ao OC mostrou ser mais eficaz na prevenção da degeneração dos SGNs comparativamente com a expressão genética de forma inespecífica em toda a cóclea. Seis meses após a inoculação, a sobrevivência dos SGNs foi maior na cóclea tratada com NT comparativamente com a cóclea contralateral, mas esta terapia não parece permitir a manutenção dos SGNs a longo prazo. Assim, devem ser consideradas outras populações de células para a transdução. Uma população possível poderia ser as células de Schwann dos SGNs, que poderão permitir a expressão a longo prazo e, por sua vez, promover uma maior sobrevivência dos SGNs e das suas fibras periféricas. No entanto, a terapia genética direcionada ao OC não deve ser descartada. Em primeiro lugar, a degeneração do OC nos modelos animais após o dano ototóxico progride muito mais rápido do que nos seres humanos e, como tal, seis meses de surdez podem equiparar-se a décadas nos seres humanos. Em segundo lugar, nem todas as formas de surdez resultam na degeneração completa do OC e a terapia genética dirigida ao OC nessas formas de surdez pode ser clinicamente viável.

Em terceiro lugar, embora vários outros métodos tenham sido utilizados experimentalmente para introduzir as NTs na cóclea surda com diferentes graus de sucesso, a sua capacidade de fornecer suporte a longo prazo ainda não foi demonstrada [18,22,24].

Embora os modelos de ratinho sejam essenciais para testar possíveis estratégias terapêuticas, o atraso no início da maturação funcional em ratinhos e humanos dificulta a aplicação dos estudos nos humanos. Além disso, para mutações que causam surdez profunda, as estratégias de entrega dos genes podem nunca ser bem-sucedidas pois a perda de genes críticos para as CCs geralmente leva a uma perda completa das mesmas. A entrega do gene *wild type* deve ocorrer no contexto de uma CC normal, o que limita a janela de eficácia da terapia genética. Assim, a surdez progressiva é o melhor alvo para esta abordagem terapêutica [6].

É importante salientar que esta investigação está apenas a começar. Há vários obstáculos que têm de ser superados para que a terapia genética possa ser usada de forma eficaz e segura na prática clínica. Talvez o maior obstáculo envolva a inespecificidade celular dos sistemas de administração de genes [6,11]. No caso da administração de ATOH1 mediada por vírus, CCs ectópicas foram produzidas em regiões inesperadas do OC, o que é problemático do ponto de vista clínico. Além disso, os próprios vetores virais podem ter um risco significativo para a saúde e a injeção segura de partículas virais no ducto coclear requer um procedimento cirúrgico complicado que ainda não foi otimizado. Vários investigadores estão a desenvolver novas gerações de vetores com o objetivo de proporcionar mais segurança a uma população clínica. Além disso, estão a ser desenvolvidos vetores específicos para determinados tipos celulares. Já estão disponíveis múltiplos serotipos de AAV que visam diferentes tipos celulares do ouvido interno e têm o potencial de permitir a expressão seletiva de ATOH1 em determinadas células. Além disso, como ATOH1 pode mediar apenas um de vários caminhos paralelos de diferenciação das CCs, é provável que seja necessário focarmo-nos noutras moléculas e limitarmos a ativação de ATOH1 para uma janela de tempo mais estreita. Mesmo nas células certas e no tempo certo, alcançar o nível de expressão ótima enquanto se minimiza a sobre-expressão tóxica é um dos grandes desafios da terapia genética [1,6,8].

## Fármacos

A surdez seria idealmente tratada com fármacos. Embora a barreira sangue-labirinto possa limitar o acesso de alguns fármacos pelas vias oral ou sistêmica, a entrega direta localmente a nível do ouvido interno é uma alternativa viável e tem sido investigada [1,6,11]. A administração por via intratimpânica depende da difusão da substância ativa através da membrana da janela redonda (RWM) até ao ouvido interno, enquanto a via intracoclear oferece acesso direto ao ouvido interno, permitindo obter uma maior biodisponibilidade do fármaco. No entanto, a via intratimpânica é a que tem maior potencial de ser usada na clínica por ser muito menos invasiva [12,33].

Os doentes com maior probabilidade de resposta ao tratamento farmacológico da surdez são aqueles com alterações patológicas limitadas ou com surdez progressiva. Têm sido discutidas várias possíveis áreas-alvo para o desenvolvimento de fármacos no contexto do tratamento da NSHL, embora ainda não haja nenhum que tenha sido aprovado pela FDA [6,12].

Talvez seja possível associar a utilização de fármacos a uma abordagem regenerativa. Por exemplo, poderiam ser desenvolvidos fármacos que regulassem a expressão de genes importantes para o desenvolvimento e função das CCs. A reparação das estruturas danificadas na CC deve basear-se na ativação de programas endógenos que promovam a homeostase celular.

Os canais iónicos ou as junções comunicantes envolvidos no transporte do potássio podem ser alvos úteis de intervenção farmacológica, estando a ser investigados moduladores da sua atividade [6,12].

No ouvido interno, um défice de magnésio resulta na diminuição do gradiente eletroquímico necessário para a transdução sensorial. Na tentativa de restaurar este gradiente, as CCs gastam energia, o que pode levar à morte celular. Também é possível que o défice extracelular de magnésio leve à libertação de hormonas que diminuam o tônus muscular, reduzindo o fluxo sanguíneo que chega a cóclea. O stress metabólico no ouvido interno, como o causado pela exposição ao ruído, implica um alto consumo energético por parte das células. Se existir concomitantemente um défice de magnésio, existe um maior potencial de dano das CCs. A suplementação de magnésio está associada a uma redução dos danos auditivos causados pela exposição ao ruído, logo esta poderá ser um potencial tratamento da SSNHL idiopática e da NIHL. É necessária



mais evidência baseada em populações de estudo maiores e com controles mais adequados para considerar os efeitos da ARHL, exposição ao ruído, doenças auditivas e níveis individuais de magnésio [7].

A sobreprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode estar envolvida na patogênese da SNHL. A mitocôndria desempenha um papel fundamental na geração de ROS e mutações em genes que afetam a função mitocondrial estão associados a formas genéticas de surdez. Em modelos animais, a exposição ao ruído induz a geração de ROS no ouvido interno e a perda de CCs. Com o aumento da intensidade do ruído e do tempo de exposição ao mesmo, o dano tornou-se mais extenso e irreversível. Pensa-se que as ROS também desempenhem um papel importante na ARHL [6,12].

Antioxidantes, como a glutatona e o ácido ascórbico, atenuaram a NIHL em modelos animais quando administrados antes da exposição ao ruído. Outros antioxidantes, como agonistas do recetor de adenosina A1 e a N-acetilcisteína, atenuaram a NIHL quando administrados até 3 dias após a exposição ao ruído. Polimorfismos no gene que codifica a catalase foram associados a uma maior susceptibilidade a NIHL em seres humanos o que indica que as enzimas antioxidantes podem ser cruciais na manutenção da audição normal sob condições de ruído extremo [6,32]. A administração de D-metionina oral em casos de NIHL já está em estudo clínico (fase III) [12,40].

Vários estudos em animais comprovam proteção contra a NIHL, ou recuperação mais eficaz da mesma, quando as cascatas apoptóticas são bloqueadas, já tendo sido demonstrado o valor terapêutico da interferência com a apoptose [6,12].

Os esforços destinados a prevenir a ototoxicidade dos aminoglicosídeos têm-se focado na defesa contra os efeitos prejudiciais das ROS. Em modelos animais, a proteção contra a ototoxicidade dos aminoglicosídeos foi conseguida com quelantes de ferro e com uma ampla gama de antioxidantes. Foram obtidos resultados favoráveis em humanos com o salicilato [6]. Agentes anti-inflamatórios, como os corticosteroides, previnem, limitam e reverterem a resposta inflamatória a nível das CCs e neurónios do ouvido interno. Podem ser dados como prevenção da ototoxicidade associada aos aminoglicosídeos ou também podem ser usados para tratar as lesões que daí advêm. No entanto, é uma preocupação que a proteção contra a ototoxicidade possa reduzir a eficácia clínica dos aminoglicosídeos. Uma estratégia mais eficaz pode ser a dissociação química dos efeitos ototóxicos dos efeitos terapêuticos através de mudanças na estrutura dos aminoglicosídeos [32].

Já foram propostos vários fármacos como possíveis agentes de proteção contra a ototoxicidade induzida pela platina, incluindo antioxidantes e anti-inflamatórios [6,32]. Contudo, alguns destes podem interferir com os seus efeitos benéficos. O tiosulfato de sódio mostrou-se eficaz na prevenção da ototoxicidade em crianças e adultos, sem reduzir os efeitos terapêuticos. Já foram desenvolvidos medicamentos alternativos que não possuem platina, embora a sua eficácia seja menor. Tal como para os aminoglicosídeos, o desenvolvimento de modificações químicas que levem a uma diminuição de captação nas CCs sem alteração da eficácia terapêutica é uma estratégia muito esperada [6,43].

As CCIIs formam sinapses com os neurónios aferentes e até 30% dessas sinapses perdem-se após danos causados pelo ruído, ocorrendo a perda seletiva de algumas fibras nervosas. A perda sináptica não é necessariamente acompanhada pela morte imediata de neurónios, logo a entrega de moléculas que promovam o desenvolvimento dos terminais das fibras nervosas e o aumento da inervação sináptica é de extremo valor clínico [6]. As NTs, outros fatores de crescimento ou os seus recetores são áreas-alvo interessantes para o desenvolvimento de fármacos para algumas formas de NIHL [6,32].

As CCEs formam sinapses com os neurónios eferentes. Estes fornecem um feedback evocado pelo som de forma a reduzir a amplificação coclear. Um dos principais componentes do nervo eferente é colinérgico e depende dos recetores CHRNA9 e CHRNA10. A sobre-expressão de CHRNA9 em CCEs reduz consideravelmente os danos causados pelo ruído. A expressão de um CHRNA9 mutante que aumenta a magnitude e a duração dos efeitos colinérgicos eferentes também é protetor. Como o feedback eferente tem um papel tão importante na proteção do sistema auditivo, a ativação farmacológica dos neurónios eferentes pode prevenir tanto a NIHL como a ARHL [1,6,41].

A stria vascularis é importante para a reciclagem do potássio e para estabelecer o potencial endococlear, o qual é essencial para a audição de alta sensibilidade. Já foi descrita uma correlação da redução da vascularização da stria vascularis com o envelhecimento, o que sugere que as intervenções que mantenham a vascularização da mesma possam ter importância clínica significativa [6].

Estudos recentes indicam que corticosteroides intratimpânicos devem ser usados como tratamento inicial, combinado e de resgate na SSNHL idiopática. Corticosteróides administrados através da RWM no ouvido interno conduzem a

concentrações mais elevadas na perilinfa comparativamente à sua administração sistémica em casos de SSNHL idiopática com perda auditiva até 70 dB. No entanto, a dosagem, frequência e duração do tratamento intratimpânico ainda não são claras [28,32].

## Nanotecnologia

A entrega dos possíveis agentes terapêuticos para a SNHL na área-alvo representa um desafio significativo dado o tamanho reduzido do ouvido interno e os seus compartimentos isolados por barreiras de proteção. Apesar da via intratimpânica ter um grande potencial, a sua utilização ainda é limitada porque uma grande parte do fármaco administrado não chega a atravessar a RWM, não chegando ao ouvido interno. A nanotecnologia moderna oferece uma ferramenta promissora para a entrega direcionada, não invasiva e eficiente de fármacos e biomateriais no ouvido interno. Este tipo de abordagem pode ser a chave para o tratamento bem-sucedido da SNHL [9,12,32].

Já foram criadas nanopartículas (NPs) que podem ser personalizadas para encapsular vários agentes terapêuticos de interesse [9,11]. A personalização dos atributos da NP pode permitir a aplicação não invasiva, estabilização de fármacos, libertação controlada e modificação da superfície para reconhecimento específico. A administração local de NPs demonstrou entregar com êxito biomateriais no ouvido interno através da RWM e a aplicação à clínica parece estar próxima. Certas classes de NPs apresentam características adicionais que oferecem vantagens únicas de diagnóstico e terapêutica. Por exemplo, NPs de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs), de ouro e polímeros catiónicos podem ser utilizados para a bioimagem. As propriedades magnéticas inerentes aos SPIONs também permitem um maior controlo da entrega de fármacos e dispersão dentro do ouvido interno. NPs tais como polímeros e lipossomas catiónicos oferecem opções vetoriais não-virais para a entrega da terapia genética, permitindo a redução da imunogenicidade, resposta inflamatória e risco de mutagenese [12,32].

Uma vez que a superfície da NP contacta com sistemas biológicos, as suas características afetam muito o desempenho da NP *in vivo* e a eficácia geral. A terapia dirigida a determinados tipos celulares envolve a adição de ligandos específicos dos

receptores dessas células à superfície da NP. A eficácia destes ligandos de superfície depende da sua estabilidade e especificidade. Revestimentos com várias camadas podem ser úteis na apresentação de ligandos diferentes ou outras propriedades de superfície em diferentes momentos. Alterar a química da superfície das NPs manipuladas com polímeros hidrofílicos biocompatíveis aumenta o tempo de circulação e atrasa a remoção das NPs pelos fagócitos mononucleares, permitindo assim a chegada aos tecidos-alvo e a entrega do agente terapêutico. Esta estratégia irá ampliar o caminho para um tratamento mais eficiente e específico da SNHL [9,32].

Um fármaco estudado para o tratamento da NIHL é o antioxidante edaravona, já tendo sido demonstrada a sua utilidade no tratamento desta forma de surdez. Já foi estudada a entrega de NPs de edaravona *in vivo* no ouvido interno de porquinhos-da-Índia com NIHL. A entrega intratimpânica de edaravona inibiu a geração de radicais livres na cóclea e diminuiu os limiares auditivos após o trauma acústico, embora não tenha permitido uma recuperação auditiva significativa. O uso de biomarcadores identificados pode melhorar a eficiência da entrega dos fármacos. A prestina é uma proteína de eletromotilidade que é expressa apenas na superfície das CCEs. Vários estudos já mostraram que NPs direcionadas à prestina aumentaram a ligação específica com as CCEs em cócleas de ratinhos. A combinação de NPs com edaravona direcionadas à prestina para a entrega no ouvido interno pode aumentar significativamente a eficiência da entrega e a eficácia terapêutica [11].

A entrega específica de biomateriais no ouvido interno através de NPs não teve resultados consistentes *in vivo* principalmente devido à natureza líquida das nanoformulações e ao seu baixo potencial de bioretenção no ouvido interno. Para melhorar a entrega local dos fármacos no ouvido interno foi proposto um sistema de entrega com nanohidrogel, que combina a nanotecnologia com um hidrogel. Os hidrogéis têm uma elevada viscoelasticidade, o que lhes permite permanecer mais tempo na RWM e, desta forma, libertar as moléculas encapsuladas continuamente ao longo do tempo de forma não invasiva. A combinação deste nanohidrogel com técnicas de direcionamento será potencialmente capaz de entregar biomateriais terapêuticos em locais específicos do ouvido interno no tratamento da SNHL [11,42].

A prevenção da ototoxicidade induzida por cisplatina já foi demonstrada com a administração de antioxidantes. No entanto, não só estes fármacos são limitados pela ineficiência da entrega no ouvido interno, como também não podem ser removidos do ouvido interno após se juntarem com a toxina. A acumulação dos complexos toxina-

fármaco pode causar toxicidade secundária no ouvido interno. A nanotecnologia pode oferecer uma solução não invasiva para o tratamento da ototoxicidade induzida por cisplatina. As SPIONs são capazes de atravessar a RWM para a entrega no ouvido interno. Mais importante ainda, a sua entrega pode ser controlada por um campo magnético externo através da aplicação de um íman. A remoção subsequente do íman leva à dispersão uniforme das SPIONs pela perilinfa. Além disso, o revestimento peguillado das SPIONs pode permitir a bioconjugação com a glutathione, dado que esta se liga ao alvo desejado: a cisplatina. Este processo é conhecido como nanodíálise. Estudos futuros incluirão a conjugação de glutathione a SPIONs para a entrega no ouvido interno, consequente ligação com a cisplatina e posterior remoção através dum íman aplicado externamente [11,12].

As NPs demonstraram ter um potencial significativo de entrega seletiva de fármacos e material genético para o ouvido interno na prevenção ou tratamento da SNHL. Prevê-se que o sistema de entrega dirigida com nanohidrogel possa fornecer agentes terapêuticos e biomateriais de forma eficaz e não invasiva aos locais de lesão específicos do ouvido interno, podendo ultrapassar as limitações do tratamento atual da SNHL. Espera-se que o sistema de nanodíálise possa ser efetivamente usado para a desintoxicação de diferentes tipos de ototoxicidade pois isso beneficiaria muito os doentes que não podem comprometer as suas modalidades críticas de tratamento, apesar do alto risco de ototoxicidade. Ainda é necessário otimizar as NPs de forma a promover a entrada no ouvido interno e nas células específicas, a sobrevivência e a libertação da carga no citoplasma ou a passagem pelos poros nucleares para a entrega intranuclear [11,12,32].

## Conclusão

Há 30 anos atrás, era impossível imaginar que algum dia se repararia a cóclea danificada através da regeneração do epitélio sensorial auditivo. As revoluções tecnológicas modernas tornaram abordagens experimentais anteriormente consideradas impensáveis em processos rotineiros, o que possibilitou oportunidades científicas e terapêuticas notáveis. É necessário incentivar o desenvolvimento de fármacos que protejam contra a surdez ou estimulem a regeneração após dano, os quais teriam um impacto muito positivo e abrangente na saúde.

Embora os modelos animais demonstrem a possibilidade de SCs se desenvolverem em CCs e neurónios auditivos, os desafios da sobrevivência e do crescimento dos mesmos devem ser superados antes do uso clínico ser considerado.

É essencial percebermos a causa e a extensão da surdez de um indivíduo pois essa compreensão ajudará a determinar qual a estratégia terapêutica mais apropriada. Além disso, também é importante considerar o nível de ruído do ambiente onde o doente vive e trabalha, e outros problemas genéticos que podem potencialmente agravar a surdez. Assim, é improvável que uma única estratégia terapêutica seja uma cura eficaz, sendo mais útil a combinação de abordagens para atingir a reparação coclear.

Paralelamente à procura de novas soluções terapêuticas para os casos de SNHL, deve também existir uma forte promoção da prevenção ativa da surdez, ação que já foi recomendada pela OMS devido ao enorme número de casos evitáveis de SNHL que ainda existem atualmente. Devem ser feitas campanhas que divulguem e recomendem práticas que protejam os ouvidos de ruídos muito intensos em atividades ocupacionais ou de lazer, como a instalação de sensores de medição do ruído e o uso de protetores auditivos. Além disso, também deve ser recomendada a prevenção da ototoxicidade.

O futuro do tratamento da SNHL depende do desenvolvimento de estratégias minimamente invasivas, sistemas de administração de fármacos controlados e da combinação de sistemas de entrega de forma a se chegar diretamente às células sensoriais do ouvido interno. Embora já tenham sido feitos inúmeros progressos no desenvolvimento de métodos de entrega mais seguros, ainda é necessária uma tecnologia simples, aceitável e segura para o tratamento bem-sucedido da SNHL.

Apesar dos progressos alcançados nesta área, a população continua a envelhecer e o número de doentes que sofre de surdez grave continua a aumentar. Devemos permanecer tanto cautelosos quanto otimistas enquanto tentamos reparar e regenerar um dos dispositivos mecanossensoriais mais delicados da natureza: o ouvido interno humano.

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha família e amigos, por todo o apoio que me ofereceram ao longo do meu percurso acadêmico. Agradeço ainda ao Professor Doutor Óscar Dias pelo acolhimento da minha tese na Clínica Universitária de Otorrinolaringologia e por toda a disponibilidade e simpatia.



## Bibliografia

1. Holt, G. S. (2014). Sound Strategies for Hearing Restoration. *Science*, 344(6184), 1241062.
2. Wei Chen, N. J. (11 de Outubro de 2012). Restoration of auditory evoked responses by human ES cell- derived otic progenitors. *Nature*, 490(7419), 278-282.
3. Takayuki Okano, M. P. (2012). Stem Cell Therapy for the Inner Ear: Recent Advances and Future Directions. *Trends in Amplification*, 16(1), 4-18.
4. Edwin W Rubel, S. A. (Janeiro de 2013). A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Hearing Research*, 297, 42-51.
5. Lisa N Gillespie, R. T. (Novembro de 2014). Treating hearing disorders with cell and gene therapy. *Journal of Neural Engineering*, 11(6), 065001.
6. Barr-Gillespie, U. M. (Março de 2015). New treatment options for hearing loss. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14, 346–365.
7. Coates, L. (2010). *The effects of magnesium supplementation on sensorineural hearing damage: A critical review of the literature*. University of Western Ontario: School of Communication Sciences and Disorders.
8. Parker, M. A. (Dezembro de 2011). Biotechnology in the Treatment of Sensorineural Hearing Loss: Foundations and Future of Hair Cell Regeneration. *Journal of Speech, Language and Hearing Research*, 54, 1709-1731.
9. Xingxing Wen, S. D. (2016). Nanomedicine strategy for optimizing delivery to outer hair cells by surface-modified poly(lactic/glycolic acid) nanoparticles with hydrophilic molecules. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 5959–5969.
10. Park, Y.-H. (18 de Agosto de 2015). Stem Cell Therapy for Sensorineural Hearing Loss, Still Alive? . *Journal of Audiology and Otology*, 19(2), 63-67.
11. Lilun Li, T. C. (2017). Advances in nano-based inner ear delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 108, 2-12.
12. Vibhuti Agrahari, V. A. (2017). Inner ear targeted drug delivery: What does the future hold? *Therapeutic delivery*, 179-184.
13. Karl R. Koehler, A. M. (2013). Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature*, 500(7461), 217-221.

14. Martin Schwander, B. K. (2010). The cell biology of hearing. *The Journal of Cell Biology*, 9-20.
15. Kikuchi T, A. J. (2000). Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Medical Electron Microscopy*, 51-56.
16. Blake S. Wilson, D. T. (2003). Cochlear Implants: Some Likely Next Steps. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5, 207-249.
17. Karina Needham, T. H. (Janeiro de 2014). Electrophysiological properties of neurosensory progenitors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*, 12(1), 241-249.
18. Patrick J. Atkinson, A. K. (22 de Abril de 2014). Viability of Long-Term Gene Therapy in the Cochlea. *Nature - Scientific Reports*, 4(4733).
19. Mohammad Ronaghi, M. N.-D.-M. (2014). Inner Ear Hair Cell-Like Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 23(11), 1275-1284.
20. Mark A. Parker, D. A. (Outubro de 2007). Neural Stem Cells Injected into the Sound-Damaged Cochlea Migrate Throughout the Cochlea and Express Markers of Hair Cells, Supporting Cells, and Spiral Ganglion Cells. *Hearing Research*, 232(1-2), 29-43.
21. Yong-Ho Park, K. F. (Abril de 2014). Conditioning the Cochlea to Facilitate Survival and Integration of Exogenous Cells into the Auditory Epithelium. *Molecular Therapy*, 22(4), 873-880.
22. Karina Needham, P. R. (Janeiro de 2013). Challenges for stem cells to functionally repair the damaged auditory nerve. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13(1), 85-101.
23. Simon Angeli, X. L. (2012). Genetics of Hearing and Deafness. 295, 1812-1829.
24. Shawn P. Saladin, Y. T. (18 de Agosto de 2015). Advancements in Treatment for Sensorineural Hearing Loss: Implications for Rehabilitation Professionals . *JADARA*, 49(3), 160-171.
25. Maggie Kuhn, M. S.-A. (2011). Sudden Sensorineural Hearing Loss: A Review of Diagnosis, Treatment, and Prognosis . *Trends in Hearing*, 15(3), 91-105.
26. Ghossaini, J. J. (2003). The Diagnostic and Treatment Dilemma of Sudden Sensorineural Hearing Loss. *Hearing Review*, 38-41.

27. C. Gunel, Y. B. (Fevereiro de 2015). Efficacy of low-dose intratympanic dexamethasone for sudden hearing loss. *Auris Nasus Larynx*, 42(4), 284-287.
28. Roberto Filipo, M., Giuseppe Attanasio, M. P., Francesca Y. Russo, M., Marika Viccaro, M., Patrizia Mancini, M., & Edoardo Covelli, M. (Março de 2013). Intratympanic Steroid Therapy in Moderate Sudden Hearing Loss: A Randomized, Triple-Blind, Placebo-Controlled Trial. *The Laryngoscope*, 123(3), 774-778.
29. Robert J. Witte, J. I. (2003). Pediatric and Adult Cochlear Implantation. *RadioGraphics*, 23, 1185-1200.
30. Hubert H. Lim, M. L. (2009). Auditory Midbrain Implant: A Review. *Trends in Amplification*, 13, 149-180.
31. Bermingham, N. A. (1999). Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science*, 1837-1841.
32. Pyykko, D. S. (2011). Nanotechnology and the treatment of inner ear diseases. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3, 212-221.
33. Yoon JY, Y. K. (2015). Intratympanic delivery of oligoarginine-conjugated nanoparticles as a gene (or drug) carrier to the inner ear. *Biomaterials*, 243–253.
34. Domenico, M. D. (2011). Towards gene therapy for deafness. *Journal of Cellular Physiology*, 2494–2499.
35. R. Sacheli, L. D. (2013). Gene transfer in inner ear cells: A challenging race. *Gene Therapy*, 237-247.
36. H. Fukui, Y. R. (2013). Gene therapy for the inner ear. *Hearing Research*, 99-105.
37. Akil, O. (2012). Restoration of hearing in the VGLUT3 knockout mouse using virally mediated gene therapy. *Neuron*, 283-293.
38. Qi W, D. D. (2014). Efficient siRNA transfection to the inner ear through the intact round window by a novel proteidic delivery technology in the chinchilla. *Gene Therapy*, 10-18.
39. Sun, H. H. (2011). Current status and prospects of gene therapy for the inner ear. *Human Gene Therapy*, 1311-1322.
40. Nguyen K, K. J. (2016). Recent advances in therapeutics and drug delivery for the treatment of inner ear diseases: a patent review (2011–2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 1-12.

41. Maison, S. F. (2002). Efferent protection from acoustic injury is mediated via  $\alpha 9$  nicotinic acetylcholine receptors on outer hair cells. *Journal of Neuroscience*, 10838–10846.
42. S.a. Lajud, D. N. (2014). A novel chitosanhydrogel-based nanoparticle delivery system for local inner ear application. *Otology & Neurotology*, 341-347.
43. Doolittle, N. D. (2001). Delayed sodium thiosulfate as an otoprotectant against carboplatin-induced hearing loss in patients with malignant brain tumors. *Clinical Cancer Research*, 493-500.
44. Wise, A. K. (2010). Effects of localized neurotrophin gene expression on spiral ganglion neuron resprouting in the deafened cochlea. *Molecular Therapy*, 1111-1122.
45. OMS. (1 de Fevereiro de 2017). *World Health Organization*. Obtido de [www.who.int: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/).